

イトメ卵の受精機構, 特に卵・精子結合過程の解析

著者	佐藤 正典
号	832
発行年	1983
URL	http://hdl.handle.net/10097/24542

氏名・(本籍)	さ　　とう　　まさ　　のり 佐　　藤　　正　　典
学　位　の　種　類	理　　学　　博　　士
学　位　記　番　号	理　博　第　8　3　2　号
学位授与年月日	昭　和　58　年　3　月　25　日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研　究　科　専　攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻
学　位　論　文　題　目	イトメ卵の受精機構，特に卵・精子結合過程の解析
論文審査委員	(主査) 教　授　長　内　健　治　　教　授　樋　渡　宏　一 教　授　小　西　和　彦

論　文　目　次

序　論

材料と方法

結　果

1. 受精過程における卵と精子の反応
 - (1) 未受精卵の構造
 - (2) 精子の構造
 - (3) 精子進入の経過
 - (4) 卵表における精子の微細構造変化
2. 精子・コンオリ結合——単離コリオンおよび固定卵を用いた解析——
 - (1) 単離コリオンと精子の結合
 - (2) 固定卵と精子の結合
3. コリオンの精子付着および先体反応誘起活性
 - (1) PTA 陽性成分の除去に伴う精子結合の減少
 - (2) PTA 陽性成分の蒸留水による抽出
 - (3) コリオンの精子付着および先体反応誘起に対する単糖共存の効果

考 察
要 約
謝 辞
文 献

論文内容要旨

一般に動物の卵は、外被構造に包まれている。従来、ウニ類を主な材料とした受精の研究により、卵外被と精子の相互作用は、受精の成立に不可欠な反応(精子先体反応、特異的な精子結合など)をもたらすことが示されてきた。しかし、卵外被の構造は動物群によって大きく異なり、その役割が統一的に説明されるには至っていない。

環形動物多毛類のイトメの場合、未受精卵は、「コリオン」と呼ばれる比較的厚い外被に包まれている。卵の微絨毛はコリオンの中に入り込み、その先端がコリオン外表面まで達している(Sato & Osanai, 1981)。筆者らは、人為的に囲卵腔を形成させた卵が精子を受容する様子を光学顕微鏡で観察し、卵の微絨毛先端が精子受容部位であると推定した(Sato & Osanai, 1981)。もしコリオンを貫く微絨毛の先端が精子と膜融合するのであれば、精子はコリオンと反応することなく直接微絨毛と反応し、これと膜融合するのか、あるいは卵・精子融合が起こるためには、それに先行する精子・コリオン相互作用が必要であるのかが問題となる。

本研究では、卵微絨毛が実際に精子と膜融合することを微細形態観察によって実証し、卵と精子の膜融合に先立つ過程にコリオンが関与するかどうか検討した。

1. 受精過程における卵と精子の反応

未受精卵は、厚さ $1 \sim 1.5 \mu\text{m}$ のコリオン(4層から成る)に包まれている。卵表層からコリオン中に突き出ている微絨毛の先端は、コリオン第1層(最外層)の構成成分によって覆われる。第1層の構成成分は、リンタングステン酸(PTA)染色によって濃染されるので、糖を含むと考えられ。一方、未反応精子の頭部は円筒形で、その先端部において、キャップ状の先体胞が核の前縁を覆っている。

受精の初期過程をノマルスキー微分干渉顕微鏡および透過型電子顕微鏡によって観察した。媒精後1分に固定された試料において、先体反応の前および後における精子とコリオンの結合が観察された。前者の場合、精子は頭部先端の外膜でコリオン第1層に結合していた。一方、後者の場合、精子は先体胞を開裂させ、それに続いて葉状の先体突起を発達させていた。先体突起の先端は、コリオン外層(第1, 2層)を通過し、吸盤状に広がって第3層表面に結合していた。このような精子は、そのまま第3層表面に留まり、コリオン内層(第3, 4層)を通過しなかった。一部の精子の先体突起の一端は、第3層の外側で卵の微絨毛先端と接触または膜融合していた。媒精後20分までに、コリオンに結合していた多くの余剰精子はコリオンから離脱するが、受精精子はなおコリオン上に留まり、その頭部は、コリオン内層中に発達した卵細胞質隆起(精子進入突起)と連結していた。

以上の観察結果は、精子が次のような一連の過程を経て、卵内に進入することを示している
1) 精子頭部がコリオン第1層に結合(付着と呼ぶ)し、続いて先体反応を起こす。2) 精子先体突起がコリオン外層を通過し、第3層に結合(接着と呼ぶ)した後、卵微絨毛先端と膜融合する。

3) 精子と膜融合した微絨毛が精子進入突起へ発達する。先体突起はコリオン内層を通過できないので、微絨毛の先端のみが精子受容部位であると判断される。

2. 精子・コリオン結合 —— 単離コリオンおよび固定卵を用いた解析 ——

先体反応の前後における精子・コリオン結合過程(付着と接着)は、卵・精子融合が起こるために必要な過程であると思われる。生卵では、結合精子の多くが、卵の受精反応に伴って離脱するため、精子・コリオン結合過程の解析が困難である。そこで、卵の反応を消去した実験系(単離コリオンまたは固定卵を用いる)によって、この過程の詳細な検討を行った。

人工海水中では、精子は先体反応を起こして単離コリオンまたは固定卵に接着した。しかし、Ca 欠如海水中では先体反応が抑制され、精子とコリオンの付着のみが起こった。この事実は、先体反応に先立つ外液 Ca 非依存性の精子・コリオン付着過程が確かに存在することを示している。付着反応は、同種精子の頭部先端に限って起こる種および部域特異的な反応であるため、最初の卵・精子認識過程として機能していると考えられる。

固定卵上での付着反応は、精子頭部先端とコリオン第1層の繊維状成分(PTA 陽性成分)との間で起こり、Ca 存在下ではこれに引き続いて精子先体反応が開始されると思われる。一方、単離コリオンでは、第1, 2層の構造が認められないが、第3層に相当する部分が PTA 染色に対して陽性であった。精子は、この PTA 陽性層に付着し、そこで先体反応を起こした。これらの事実から、コリオン外表面に局在する PTA 陽性成分(糖を含む成分)が、精子付着および先体反応誘起に関与している可能性が提起された。

3. コリオンの精子付着および先体反応誘起活性

コリオンの PTA 陽性成分の除去によって、コリオンの精子付着活性および先体反応誘起活性が失われるかどうか調べた。未受精卵を0.1%プロナーゼで20分間処理することにより、コリオン外層がほぼ完全に消失し、コリオンの外表面は PTA で染まらなくなった。このような卵を軽く固定し、よく洗った後に媒精した。精子はほとんど卵に結合しなかった。

次に、単離コリオンを蒸留水(DW)で処理することによって、コリオンから精子付着活性および先体反応誘起活性を分離することを試みた。コリオンを DW 中に30分以上放置すると、コリオン外表面に局在する PTA 陽性成分が減少した。DW 処理後のコリオンに媒精した場合、精子はほとんどコリオンに結合しなかった。一方、コリオンをサスペンドした DW をろ過し海水を加えたもの(コリオン抽出液)は、先体反応誘起活性をもっていた。

以上の結果から、精子付着活性および先体反応誘起活性は、共にコリオンの PTA 陽性物質(通常は第1層に局在する)またはそれと挙動を共にする物質中に含まれると考えられる。

PTA 陽性物質中の糖鎖が精子付着または先体反応誘起に関与している可能性を検討するため、8種類の単糖(70~100mM)の存在下で卵・精子結合状態を観察した。この結果、マンノースまたは N-アセチルガラクトサミンが、精子とコリオンの付着には影響せず、精子先体反応を

抑制することが見出された。したがって、精子付着過程と先体反応誘起過程は独立した反応系であることが推定される。精子先体反応の誘起過程に、これらの糖がどのように関与しているのか、また精子付着反応の分子機構がいかなるものなのかを解明することが今後の課題である。

本研究によって得られた結果は、次のようにまとめられる。イトメ卵の受精は、先体反応に先立つ精子とコリオン最外層の特異的な付着によって開始される。この付着は、それに引き続く先体反応誘起過程に密接に関連していることが予想される。先体反応に伴って精子の先体突起がコリオン外層を通過し、内層へ接着することにより、精子先体突起が卵微絨毛先端と膜融合することが可能となる。したがって、精子と卵(微絨毛)の膜融合が成立するためには、上記のコリオン・精子相互作用が必要であると結論される。

論文審査の結果の要旨

動物卵を包む卵外被と精子の相互作用は受精の成立に必要な過程として重視されている。しかし、外被の構造は動物によって著しく異っていて、その役割に関して統一的理解に到っていない。環形動物多毛類の一種、イトメの卵はゼリー層を持たず、厚いコリオンに包まれ、微絨毛がコリオン中に突出しているなど特徴的な構造を持っている。佐藤正典はこの特性に注目し、イトメ卵への精子の進入過程、特にコリオンとの相互関係を解析した。

まず、受精の初期過程を電子顕微鏡を用いて追跡し、コリオン上での精子の先体反応、先体突起のコリオン外層通過とコリオン内層への接着を経て、先体突起が卵微絨毛先端と融合することを明かにした。

次いで、単離コリオンと固定卵を用いて、コリオンへの精子結合を解析し、精子の先体反応に先立って精子頭頂部外表とコリオン外層との付着の段階が存在し、これが先体反応の誘起とコリオン外層の通過に必要なことを示唆した。また、先体突起の外層通過および内層表面への接着が卵微絨毛先端との融合に必要なことを示した。

さらに、単離コリオンから精子付着および先体反応誘起活性を抽出することに成功し、コリオンの燐タングステン酸陽性層(最外層)がこれらの活性の局在部位であり、先体反応誘起活性に糖が関与している可能性を示唆した。

以上の成果は、多毛類の受精機構の研究に重要な新知見を加えたものであり、精子と卵外被の相互作用の受精における役割の一般的理解に貢献するもので、著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって、佐藤正典提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。